TOYO INK

MultiColor-Luc™ Reporter Vector Series

取扱い説明書

目次

東洋ビーネット株式会社

2005.10.

Ⅰ．「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」の概要

レポーター遺伝子を用いた試薬システムは、真核細胞における遺伝子の発現や制御に関する研究に貢献しています。弊社が開発した「ピッカジーン®」シリーズは、ホタル･ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ･システムとして、多くの研究者の方々にご利用いただいております。

弊社はこの技術と経験を応用し、NEDO プロジェクトの支援のもと、産業技術総合研究所･近江谷先生との共同研究によって、従来のホタル･ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは不可能であった複数の転写活性の同時測定システムを開発しました。

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」は、ホタルとは異なる甲虫から得られた、赤（RED）、緑（GR）、オレンジ（OR）の発光色の異なる 3 種のルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとし、1 種類の試薬で同時発光させるシステムです。このシステムの専用試薬である「MultiColor-Luc™ Reporter Vector」シリーズは、時計遺伝子の発現リズム測定に代表される非破砕系測定（リアルタイム測定）と、細胞溶解してレポーター遺伝子の発現量を測定する破砕系測定の両方に使用することができます。どちらの系でも得られた 3 色の混合光を色識別できるルミノメーターを用いることにより単色光量が測定可能です。さらに破砕系では、2 因子のレポーターアッセイ、あるいはインターナル･コントロールを用いた 2 因子のレポーターアッセイが、同一の検体で 1 度に測定することができるようになります。

「MultiColor-Luc™ Reporter Vector」シリーズは、赤、緑、オレンジの各種ルシフェラーゼ遺伝子に対してマルチクローニングサイトを含むテストベクターの3種類、SV40プロモーターが挿入されたコントロールベクターの3種類、更に緑用にHSVtkプロモーターを挿入したコントロールベクター1種類の、計7種類をご用意しております。

レポーター遺伝子（発光波長）	マルチクローニングサイトを含む	SV40 プロモーター及びエンハンサーを含む	HSV tk プロモーターを含む
SLG (550nm)	pSLG-test Vector	pSLG-SV40 Control Vector	pSLG-HSVtk Control Vector
SLO (580nm)	pSLO-test Vector	pSLO-SV40 Control Vector	
SLR (630nm)	pSLR-test Vector	pSLR-SV40 Control Vector	

また、破砕系測定は、弊社が開発した発光キット「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」によって、最適な発光反応およびアッセイ系を得ることができます。特許出願中の「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」は、専用細胞溶解剤と発光試薬の 2 試薬で構成されています。

〈ライセンスに関する注意事項〉

- 本システムで用いている発光遺伝子は、独立行政法人 産業技術総合研究所 近江谷先生が特許出願をされています。東洋ビーネット㈱は、独立行政法人 産業技術総合研究所の許諾を受けております。
  発光遺伝子の産業用途等の営利目的の使用については、別途ライセンス契約が必要となります。
- 本取扱説明書内にある「ルミネッセンサーMCA」及び「クロノス（アトー株式会社, No.AB-2500）」に関する記載は、アトー株式会社の特許(第 3585439 号)です。説明書内での特許内容に関する記載は同社による許可を受けております。算出式の使用、ライセンスに関しては各装置メーカーにお問い合わせください。
- 本製品は研究用試薬です。臨床診断用試薬としては使用しないでください。
- ライセンス契約に関しては、東洋ビーネッ（株）[Tel：03-3272-1954]までお問い合わせください。

II． 製品構成

メーカーコード	品　名	容 量	保 存
MCL-V11	MultiColor-Luc™ pSLG-test Vector SLGプロモーター挿入用ベクター (緑色発光用)	20μg	-20℃
MCL-V12	MultiColor-Luc™ pSLO-test Vector SLOプロモーター挿入用ベクター (オレンジ色発光用)	20μg	
MCL-V13	MultiColor-Luc™ pSLR-test Vector SLRプロモーター挿入用ベクター (赤色発光用)	20μg	
MCL-V14	MultiColor-Luc™ pSLG-SV40 Control Vector SLG SV40コントロールベクター (緑色発光用)	20μg	
MCL-V15	MultiColor-Luc™ pSLO-SV40 Control Vector SLO SV40コントロールベクター (オレンジ色発光用)	20μg	
MCL-V16	MultiColor-Luc™ pSLR-SV40 Control Vector SLR SV40コントロールベクター (赤色発光用)	20μg	
MCL-V17	MultiColor-Luc™ pSLG-HSVtk Control Vector SLG HSVtkコントロールベクター (緑色発光用)	20μg	
MCL-VS1	MultiColor-Luc™ Test Vector Set pSLG-test、pSLO-test、pSLR-test Vector 各1本	各20μg ×3本	
MCL-VS2	MultiColor-Luc™ Control Vector Set pSLG-SV40 Control、pSLO-SV40 Control、 pSLR-SV40 Control Vector 各1本	各20μg ×3本	
MCL-VS3	MultiColor-Luc™ Vector Full Set pSLG-test、pSLO-test、pSLR-test、 pSLG-SV40 Control、pSLO-SV40 Control、 pSLR-SV40 Control、 pSLG-HSVtk Control Vector 各1本	各20μg ×7本	

保存方法

本製品はお手元に到着後-20℃の冷蔵庫に移して保存してください。

III. 「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」の原理

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」は、赤、緑、オレンジ色の発光色が異なる3つのルシフェラーゼより生じる生物発光を用いたレポーターアッセイ·システムです（図 1.）。本システムでは、単一のサンプル中で、発光色の異なる2つ、または3つのルシフェラーゼを発現させ、各色の発光シグナルを測定します。

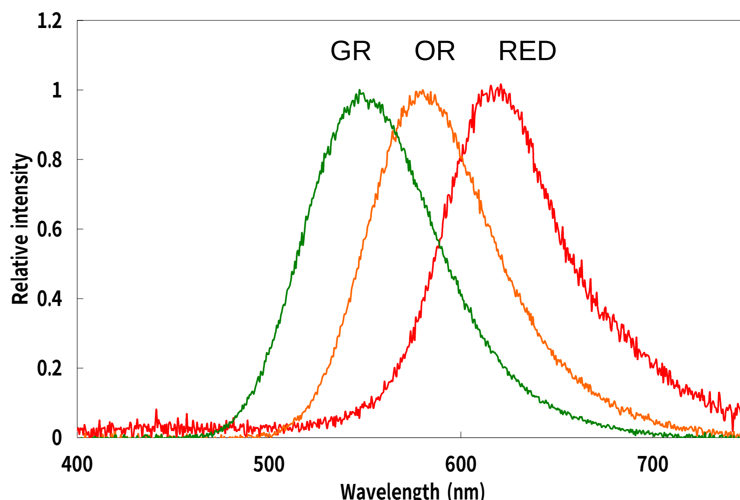


図 1. 3色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトル

ホタルに代表される生物発光は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化反応を通して光を生じます。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg^{2+})存在下において、アデノシン三リン酸(ATP)と反応した後、酸素分子と反応して励起状態となり、基底状態に戻る際に光を発します（図 2.）。同一構造のルシフェリンを用いながらも、ルシフェラーゼの違いによりルシフェリンの状態が変化し、波長の異なる発光が生じます。このため、本システムでは、2または3種の、転写活性を同時に測定することが可能となります。

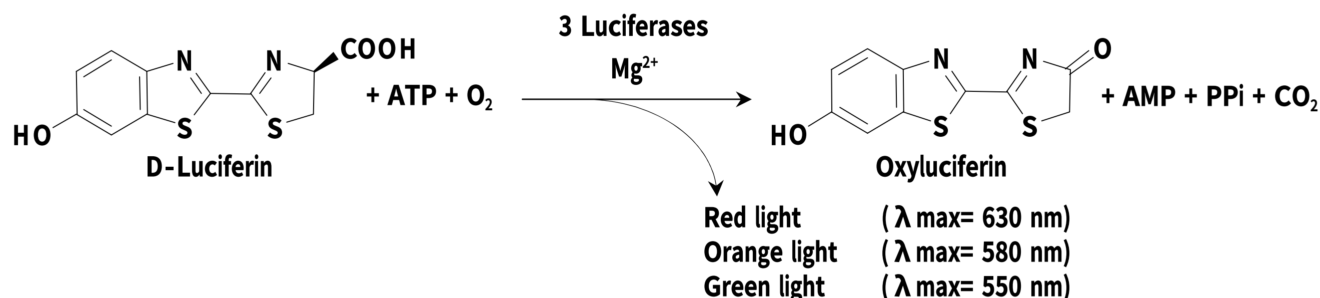


図 2 . ホタル·ルシフェリン/ルシフェラーゼ反応の発光機構

レポーターアッセイ·システムに広く用いられている北米産ホタル *Photinus pyralis* 由来のルシフェラーゼは、pH や温度などの反応条件によって発光スペクトルが緑から赤へ変化する性質を持っており、多色発光に応用できませんでした。発光色の特異性を利用する本システムでは、pH などの反応条件で発光スペクトルが影響を受けない、甲虫由来の新規ルシフェラーゼを用いています。

- 赤色ルシフェラーゼ(RED)は、鉄道虫 *Phorixothrix hirtus* に由来し、最大発光波長（λmax= 630 nm）。
- オレンジ色ルシフェラーゼ(OR)は、イリオモテボタル *Rhagophthalmus ohbai* 由来の変異体で、最大発光波長（λmax= 580 nm）。
- 緑色ルシフェラーゼ(GR)は、イリオモテボタル *Rhagophthalmus ohbai* に由来し、最大発光波長（λmax= 550 nm）。

Ⅳ. 使用方法

非破砕系発光測定 (リアルタイム測定)

- 生細胞での長時間測定を行いたい。
- 同一細胞での連続測定を行いたい。

測定

発現リズム解析

[非破砕系測定のイメージ]

甲虫ルシフェリンが持つ安定性と、細胞膜の透過性という特長を活かし、培地にルシフェリンを直接添加して、細胞内で発現したルシフェラーゼと反応した際に生じる発光を測定します。

従来の一般的なルシフェラーゼアッセイと異なり、細胞を培養しながら継続的に発光活性を測定することから『リアルタイム測定』と呼ばれております。

ベクターの選択･構築
↓
インサートの確認
↓
トランスフェクション
↓
培地中にルシフェリン (※1) を直接添加
↓
ルミノメーターでの発光測定 (※3)

※1 対応する試薬
基質の D-Luciferin は和光純薬工業㈱にお問い合わせ下さい。

破砕系発光測定

- 複数因子の転写活性測定を行いたい。
- 細胞ライセートを用いて測定を行いたい。

サンプル調製
測定･データ補正

Sample-1 Sample-2
A(+) B(+) (-)

[破砕系測定のイメージ]

『ライセート調製→発光測定』と従来の一般的なルシフェラーゼアッセイと同じ手順で実験を行います。

発光基質が共通なので、デュアルアッセイと異なり発光試薬の添加 1 回のみで操作が簡便です。
さらには 2 因子のみならず 3 因子まで測定することが可能になりました。

ベクターの選択･構築
↓
インサートの確認
↓
トランスフェクション
↓
細胞溶解･ライセート調製 (※2)
↓
発光試薬 (※2) の添加
↓
ルミノメーターでの発光測定 (※3)

※2 対応する試薬キット
MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit (MCL100, MCL500, MCL10000)

検出装置に関して (※3)

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」は、3 色の発光甲虫ルシフェラーゼにより生じる発光シグナルを発光色の違いにより検出するシステムです。そのため、測定には発光波長の違いを検出できる測定装置と、測定値からルシフェラーゼごとの発光値の算出が必要となります。以下の点に留意し、測定方法を確認のうえ、使用を検討してください。

- 測定装置の検出波長レンジが、3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトルに適した 400～800 nm(少なくとも 450～750 nm)であること。
- 3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光スペクトルに適したフィルターを選択でき、そのフィルターが装着可能であること。
- フィルターを切り替えながら、各波長域の発光量の連続測定が可能であること。
- 測定した各波長域の発光量から、3 色の発光甲虫ルシフェラーゼの発光量が算出可能であること。

Ⅷ. 測定装置の紹介(p.16)にて、対応する測定機器を紹介しております。

非破砕系（リアルタイム測定）の実験プロトコール

1）ベクターの選択

本システムでは、[1]フィルターを用いた測定装置での色識別による検出、[2]ルシフェラーゼによるプラスミド DNA 量当たりの発光活性の相違という 2 点に留意し、発現ベクターの使い分け、添加するプラスミド DNA 量の条件設定など実験系の検討が必要となります。

2 因子測定の場合は「緑」・「赤」の 2 色の組み合わせ、3 因子測定に関しては「オレンジ」を加えた「緑」・「オレンジ」・「赤」の 3 色で行うことをお勧めします。

破砕系と非破砕系ではプラスミド DNA 量あたりの発光量が異なってくることが確認されています。次ページ破砕系の実験プロトコールで示されている[図 3.]の発光量比とは異なりますのでご注意ください。

2）インサートの確認

インサートの確認は挿入配列確認用プライマー（別売）を使用してください。ご自身でプライマーを設計される場合、マルチクローニングサイトの上流にバックグラウンド低減シグナルとしてSV40 polyA signalがタンデムに配置されているため注意が必要です。専用プライマーのご使用をお勧めします。

	フォワード	リバース
pSLG-test Vector pSLO-test Vector	SLGOR-F primer （ＭＣＬ-P21）	SLGO-R primer （ＭＣＬ-P22）
pSLＲ-test Vector		SLＲ-R primer （ＭＣＬ-P23）

3）トランスフェクション

使用するレポーターの発現量の大小や、細胞株、実験条件に合わせて、<u>測定時の各ルシフェラーゼの発光活性比が近くなるよう</u>、添加するプラスミドDNA量の最適化実験を行ってください。

4）測定

培地交換の手順で、ルシフェリン(D-Luciferin Potassium Salt)を溶解させた新しい培地を加えてください。また実験に際しては発光の特定波長域が吸収される可能性があるので、<u>フェノールレッドを含まない無色培地を使用することをお勧めします。</u>

- **ルシフェリン濃度**

  培地中のルシフェリン濃度が 0.1mM になるよう調製します。しかし、細胞種の違いによる影響が考えられるため測定の前に添加するルシフェリン量の最適化実験を行うことをお勧めします。

- **培地交換**

  古い培地を除去して、ルシフェリンを溶解させた新しい培地を添加します。この後の測定で用いる機器にCO_2をコントロールする機能が無い場合は、緩衝液を加えておくことをお勧めします。

- **測定**

  任意のサイクルで発光量の測定を行います。測定条件は検出装置ごとに異なりますので、装置のマニュアルに従って実施してください。

破砕系の実験プロトコール

1) ベクターの選択

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いたアッセイ・システムでは、目的とするレポーターと共に、インターナル・コントロールをコトランスフェクションし、その値を用いてレポーターの活性値を標準化することをお勧めしています。インターナル・コントロールを用いると、以下のような要因を補正することが可能になります。

1. ウェル間の細胞数や培養状態の違い
2. プラスミド DNA のトランスフェクション効率の違い
3. 細胞ライセート回収時のハンドリング誤差
4. 測定時のピペッティング誤差

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」では、同時に 3 つのルシフェラーゼの発光活性を測定できます。このため、測定で用いる 2 または 3 色のうちの 1 つをインターナル・コントロールとして使用することから、より正確なアッセイを容易に行うことができます。本システムでは、[1]フィルターを用いた測定装置での色識別による検出、[2]ルシフェラーゼによるプラスミドDNA量当たりの発光活性の相違という 2 点に留意し、レポーターとインターナル・コントロールの使い分け、添加するプラスミドDNA量の条件設定など実験系の検討が必要となります(図 3.)。
<u>インターナルコントロールとして用いるプラスミドDNA量は、測定時にレポーターとの発光活性比が 1～100 倍以内になるよう調整してください。</u>

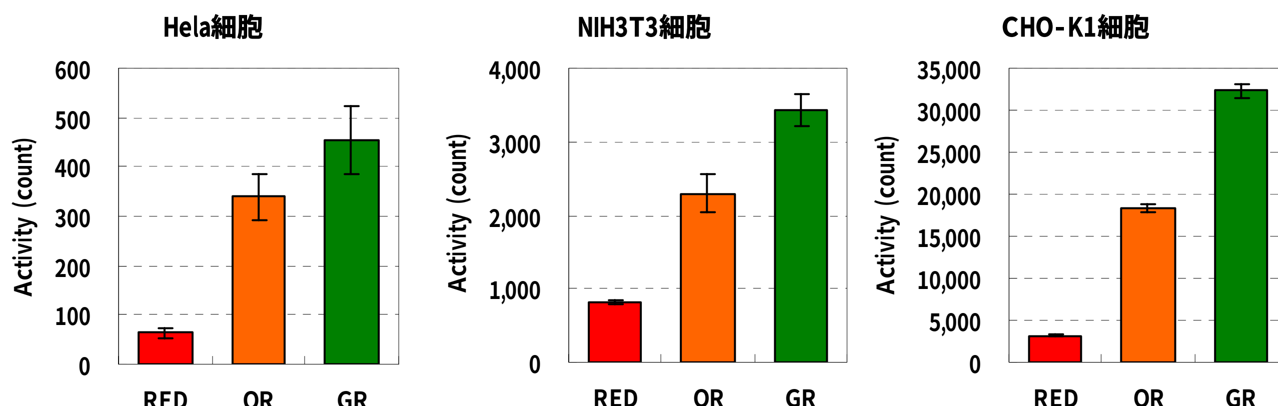


図 3.　Hela、NIH3T3、CHO-K1 細胞における各ルシフェラーゼのプラスミド DNA 量当たりの発光量比較

24wellプレートにて培養したNIH3T3, Hela, CHO-K1 細胞に各ルシフェラーゼ発現ベクターpSLR,O,G-SV40 を等量コトランスフェクションし、24 時間培養後ライセートを回収、発光活性を「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」で測定した。値は、トランスフェクションしたプラスミドDNA量当たりの各ルシフェラーゼの発光量を示す。

i． 2 色発光 (1 レポーター＋インターナル・コントロール、または 2 レポーター) の実験系

3 種のルシフェラーゼのうち 2 種を選び、1 種をレポーターとし、もう 1 種をインターナル・コントロールとして使用します。この場合、レポーターとして緑色ルシフェラーゼ (GR) 、インターナル・コントロールとして赤色ルシフェラーゼ(RED)を使用することをお勧めいたします。
2 レポーターの実験系では、発現誘導が弱いサンプルに緑色ルシフェラーゼ (GR) を用い、強いサンプルに赤色ルシフェラーゼ(RED)を用いることをお勧めいたします。

ii． 3 色発光 (2 レポーター＋インターナル・コントロール、または 3 レポーター) の実験系

2 因子の変動を測定し、インターナル・コントロールを用いて補正を行う場合、2 種のレポーターとして緑色ルシフェラーゼ(GR)とオレンジ色ルシフェラーゼ(OR)を用い、インターナル・コントロールとして赤色ルシフェラーゼ(RED)を用いることをお勧めいたします。

2) インサートの確認

インサートの確認は挿入配列確認用プライマー（別売）を使用してください。ご自身でプライマーを設計される場合、マルチクローニングサイトの上流にバックグラウンド低減シグナルとしてSV40 polyA signalがタンデムに配置されているため注意が必要です。専用プライマーのご使用をお勧めします。

	フォワード	リバース
pSLG-test Vector pSLO-test Vector	SLGOR-F primer（ＭＣＬ-P21）	SLGO-R primer（ＭＣＬ-P22）
pSLＲ-test Vector		SLＲ-R primer（ＭＣＬ-P23）

3) トランスフェクション

使用するベクターの発現量の大小や、細胞株、実験条件に合わせて、**測定時の各ルシフェラーゼの発光活性比が１～１００倍以内**になるようにインターナルコントロール量などプラスミドDNA量の最適化を行ってください。

最初、準備したベクターを１つずつ培養細胞にトランスフェクションして、ベクターごとの発光量を確認しておくことをお勧めいたします。

プラスミド DNA 量の調整で各ルシフェラーゼの発光活性比が１～１００倍以内に収まらない場合は、ベクターの組み合わせの再検討を行ってください。

4) 測定

細胞を溶解しライセートを調製する実験（破砕系）を行う場合は「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」試薬が必要です。同キットには、3 つのルシフェラーゼの発光活性を最大限に生かすことができるように最適化した細胞溶解剤と、3 種の発光カイネティクスを安定化させる発光試薬（特許出願中）の 2 試薬構成です。

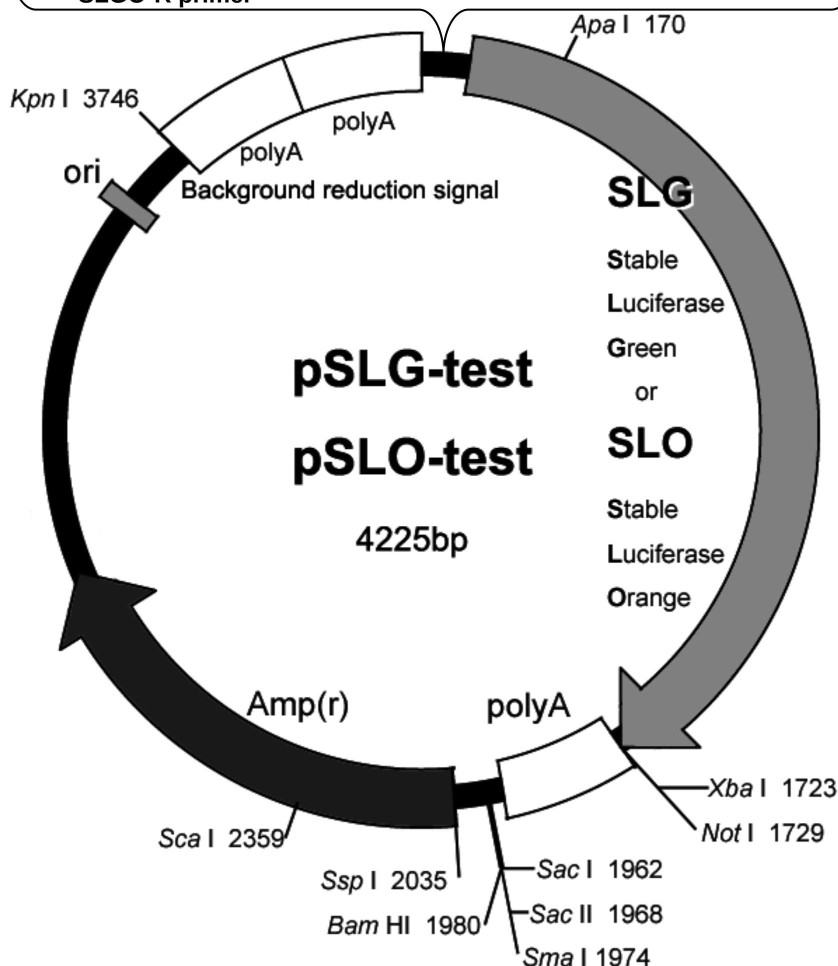
詳細なプロトコールは「MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit」の取扱い説明書にてご確認ください。

Ⅴ. ベクターマップ・配列情報

pSLG-test / pSLO-test Vector

```
          3975       3985       3995       4005       4015       4025
atcaatgtat cttatcatgt ctggatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta
  CAATGTAT CTTATCATGT CTGGATC →
  SLGOR-F primer
          4035       4045       4055       4065       4075       4085
cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt
          4095       4105       4115       4125       4135       4145
gttgttgtta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca
          4155       4165       4175       4185       4195       4205
aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc
          4215       4225               10         20         30         40
aatgtatctt atcatgtctg   ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg
                        Xho I    Sal I    Cla I  HindIII Mlu I  Nhe I

          50         60         70         80         90        100
catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca g  cccaccacc atggctaacg
Sph I  Bgl II Spe I    Eco RV  Eco RI  Pst I              SLG/SLO
         110        120        130        140        150        160
agatcatcct gcacggcgcc aagcccaggg acccccctgga cctgggcacc gccggcattc
   ←GTAGGA CGTGCCGCGG TTCGGGTC
    SLGO-R primer
```



Multiple cloning site	1-81
SLG/SLO gene	91-1722
SV40 late poly(A) signal	1736-1961
β-lactamase [Amp(r)] gene	2055-2915
background reduction signal	3752-4225
SLGOR-F primer binding site	3968-3992
SLGO-R primer binding site	105-128

図 4. pSLG-test / pSLO-test Vector のマップ及び MCS 緑色ルシフェラーゼ：SLG/オレンジ色ルシフェラーゼ：SLO の下流に SV40 late poly(A) signal が続き、このポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200～250 bp 程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。また、ポリ A 付加シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early polyA signal をタンデムに並べた Background reduction signal をルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減させています。

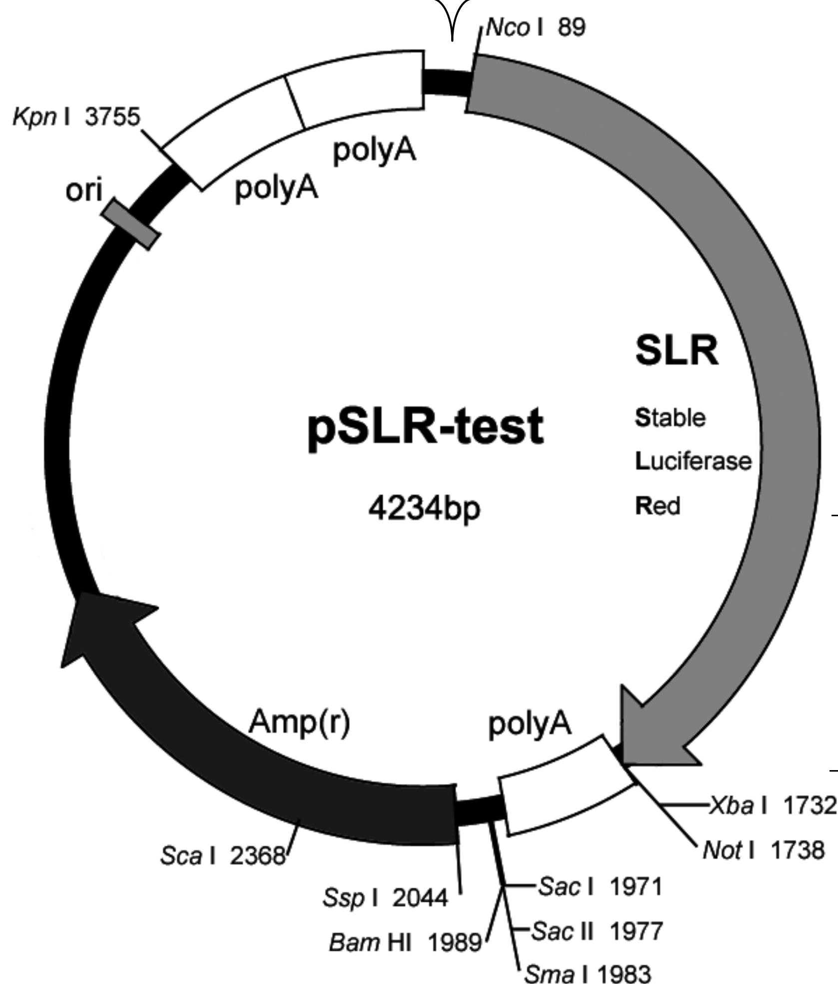
pSLR-test Vector

```
        3984      3994      4004      4014      4024      4034
atcaatgtat cttatcatgt ctggatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta
  CAATGTAT CTTATCATGT CTGGATC →
  SLGOR-F primer
        4044      4054      4064      4074      4084      4094
cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt

        4104      4114      4124      4134      4144      4154
gttgttgtta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca

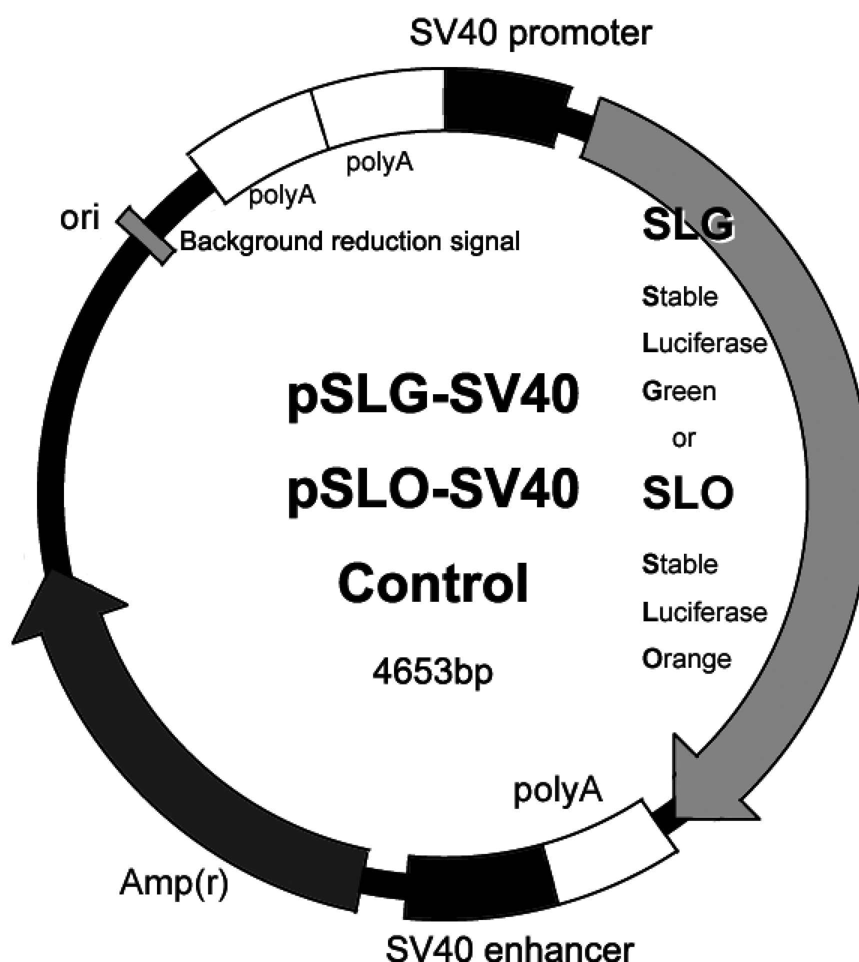
        4164      4174      4184      4194      4204      4214
aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc
       4224      4234           10         20         30        40
aatgtatctt atcatgtctg   ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg
                        Xho I  Sal I    Cla I   HindIII Mlu I  Nhe I

         50        60        70        80         90       100
catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca g  cccaccacc atggaagaag
Sph I  Bgl II Spe I       Eco RV  Eco RI Pst I            SLR
          110       120       130       140       150       160
agaacatcgt gaatggcgat cgccctcggg atctggtgtt ccctggcaca gccggcctgc
       ←GCA CTTACCGCTA GCGGGAGCCC
   SLR-R primer
```



Multiple cloning site	1-81
SLR gene	91-1731
SV40 late poly(A) signal	1745-1970
β -lactamase [Amp(r)] gene	2064-2924
background reduction signal	3761-4234
SLGOR-F primer binding site	3977-4001
SLGO-R primer binding site	108-130

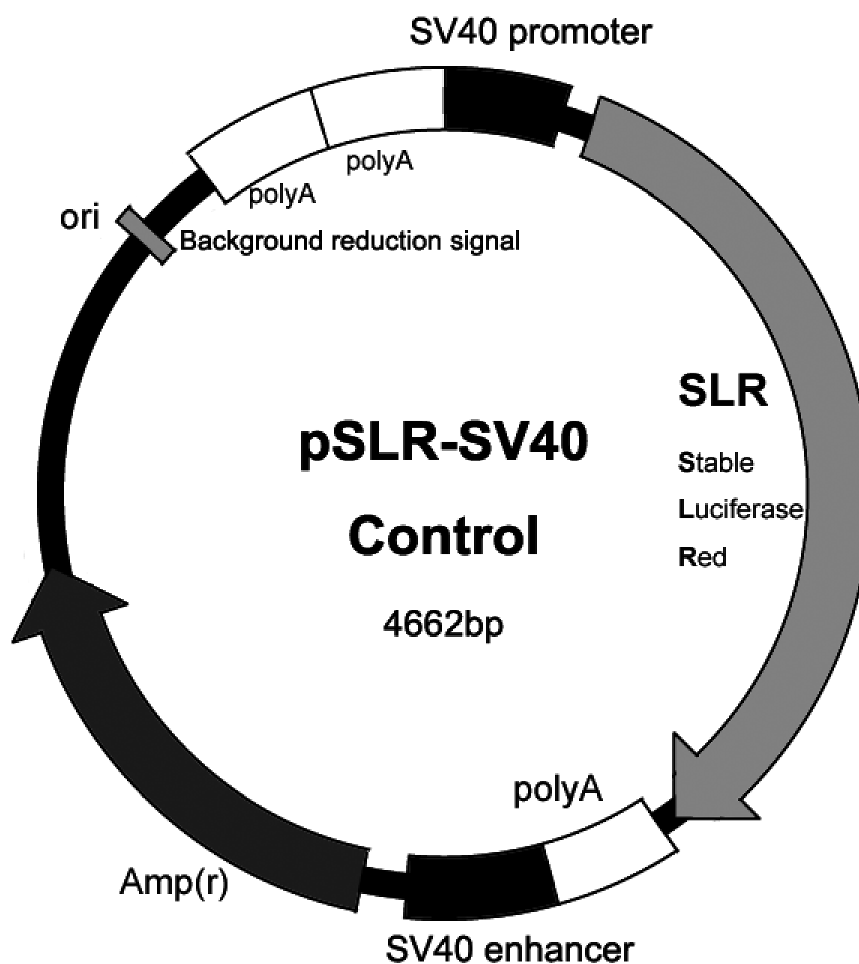
図 5. pSLR-test Vector のマップ及び MCS 赤色ルシフェラーゼ：SLR の下流に SV40 late poly(A) signal が続き、このポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200～250 bp 程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。また、ポリ A 付加シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early polyA signal をタンデムに並べた Background reduction signal をルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減させています。



SV40 early promoter	7-207
SLG/SLO gene	276-1907
SV40 late poly(A) signal	1921-2144
SV40 enhancer	2145-2389
β-lactamase [Amp(r)] gene	2483-3343
background reduction signal	4180-4653

図 6. pSLG-SV40 Control, pSLO-SV40 Control Vector のマップ SV40 Promoter 及び Enhancer は Simian virus 40 に由来する転写制御配列であり、様々な細胞種で強力な構成的発現を示します。これらのエレメントを含む control ベクターは SV40 プロモーター内に SV40 の複製起点を有するため、COS-1 及び COS-7 細胞のような SV40 large T antigen を発現する細胞では、一過性の複製が認められます。SV40 late poly(A) signal のポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200〜250 bp 程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。また、ポリ A 付加シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early polyA signal をタンデムに並べた Background reduction signal をルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減させています。

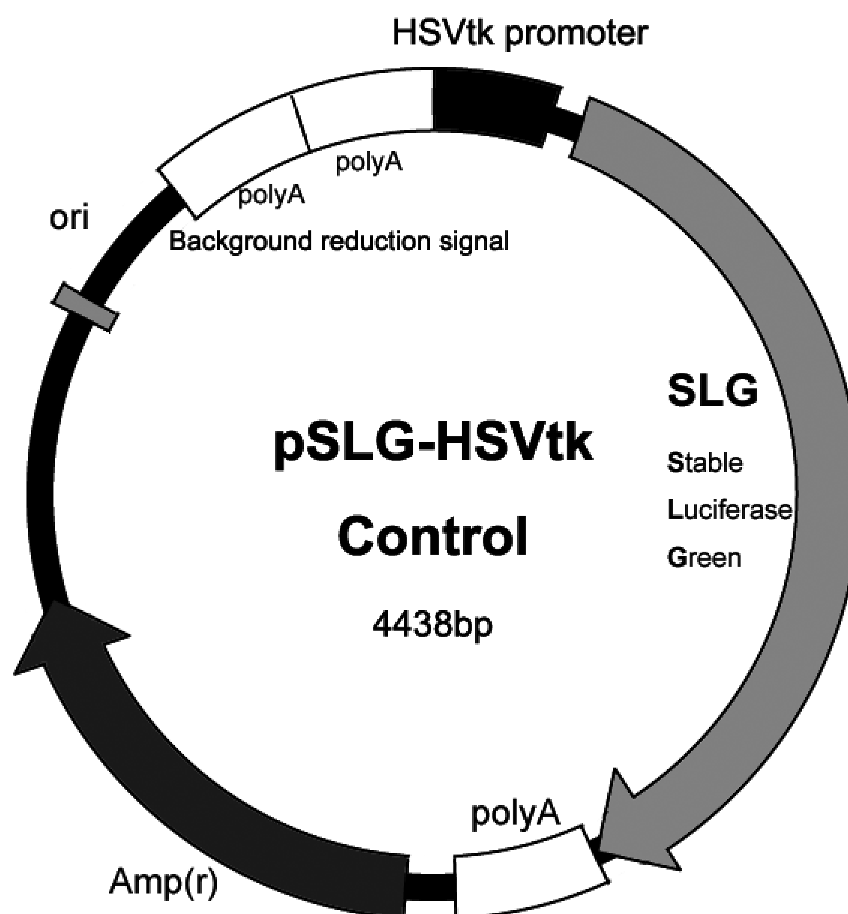
pSLR-SV40 Control　Vector



SV40 early promoter	7-207
SLR gene	276-1916
SV40 late poly(A) signal	1930-2153
SV40 enhancer	2154-2398
β-lactamase [Amp(r)] gene	2492-3352
background reduction signal	4189-4662

図 7. pSLR-SV40 Vector のマップ SV40 Promoter 及び Enhancer は Simian virus 40 に由来する転写制御配列であり、様々な細胞種で強力な構成的発現を示します。これらのエレメントを含む control ベクターは SV40 プロモーター内に SV40 の複製起点を有するため、COS-1 及び COS-7 細胞のような SV40 large T antigen を発現する細胞では、一過性の複製が認められます。SV40 late poly(A) signal のポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200～250 bp 程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。また、ポリ A 付加シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early polyA signal をタンデムに並べた Background reduction signal をルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減させています。

pSLG-HSVtk Control Vector



HSVtk promoter	7-234
SLG/SLO gene	304-1935
SV40 late poly(A) signal	1949-2174
β-lactamase [Amp(r)] gene	2268-3128
background reduction signal	3965-4438

図 8. pSLG-HSVtk Control Vector のマップ HSVtk Promoter は Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) 由来の転写制御配列プロモーターであり、低レベルの構成発現プロモーターです。SV40 late poly(A) signal のポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200～250 bp 程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。また、ポリ A 付加シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early polyA signal をタンデムに並べた Background reduction signal をルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減させています。

Ⅵ. 制限酵素部位･塩基配列等の情報

制限酵素部位･塩基配列等の情報は弊社ホームページ（http://www.toyo-b-net.co.jp）にて公開しております。お手数ですがホームページからダウンロードしてご使用ください。

Ⅶ. 関連製品

〈マルチカラールック™　アッセイシステム用ベクター専用プライマー〉

メーカーコード	品名	容量
ＭＣＬ-P21	SLGOR-F primer　挿入配列確認用プライマー （フォワード、pSLG、pSLO、pSLR共通）	200 pmoles
ＭＣＬ-P22	SLGO-R primer　挿入配列確認用プライマー （リバース、pSLG、pSLO共通）	200 pmoles
ＭＣＬ-P23	SLR-R primer　挿入配列確認用プライマー （リバース、pSLR用）	200 pmoles

〈マルチカラールック™　ＴＡクローニングキット〉

メーカーコード	品名	容量
ＭＣＬ-C11	MultiColor-Luc™ SLO TA Cloning Kit	20回用
ＭＣＬ-C12	MultiColor-Luc™ SLR TA Cloning Kit	20回用

〈マルチカラールック™　アッセイシステム用発光キット〉

メーカーコード	製品名	構成	
MCL10	MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit	発光試薬	10 ml×1 本
		細胞溶解剤	10 ml×1 本
MCL50	MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit	発光試薬	50 ml×1 本
		細胞溶解剤	30 ml×1 本
MCL1000	MultiColor-Luc™ Reporter Assay Kit	発光試薬	50 ml×20 本
		細胞溶解剤	30 ml×1 本
MCL-B30	MultiColor-Luc™ Reporter Assay Cell Lysis Buffer	細胞溶解剤	30 ml×1 本

〈ホタルルシフェラーゼ酵素セット〉

メーカーコード	品名	構成	
FL-50	ホタルルシフェラーゼ 酵素セット	ﾎﾀﾙﾙｼﾌｪﾗｰｾﾞ 酵素溶液	50μl（10μg/ml） ×1本
		希釈液	30ml×1本

Ⅷ．測定装置の紹介

「MultiColor-Luc™ Reporter Assay System」は、3色の発光甲虫ルシフェラーゼにより生じる発光シグナルを発光色の違いにより検出するシステムです。そのため、測定には発光波長の違いを検出できる測定装置と、測定値からルシフェラーゼごとの発光値の算出が必要となります。

細胞ライセートを用いた破壊系測定には、「ルミネッセンサーMCA （アトー株式会社, No.AB-2250）」を推奨します。生細胞での非破壊系測定には、「クロノス（アトー株式会社, No.AB-2500）」を推奨します。

これらには、560 nm ロングパスフィルターと 600 nm ロングパスフィルターが標準装備されており、3つまでの異なる発光波長を同時に測定し、発光波長ごとの発光値を自動算出することができます。3 つのルシフェラーゼ（RED, OR, GR）を用いた場合、3 波長の発光値を以下の係数を用いて算出されています。

a) フィルターなしの全光の測定値： F0
b) フィルター1 を透過した測定値： F1
c) フィルター2 を透過した測定値： F2
d) サンプル中に含まれる各発光波長におけるフィルター透過率
RED のフィルター1 透過率： T1r　　OR のフィルター1 透過率： T1o　　GR のフィルター1 透過率：T1g
RED のフィルター2 透過率： T2r　　OR のフィルター2 透過率： T2o　　GR のフィルター2 透過率：T2g

RED, OR, GR ルシフェラーゼの発光値 R、O、G は、各ルシフェラーゼのフィルター透過率に比例することから、下記のような式で表すことができます。

$$F0= R + G + O$$
$$F1= [T1r * R] + [T1o * O] + [T1g * G]$$
$$F2= [T2r * R] + [T2o * O] + [T2g * G]$$

したがって、RED, OR, GR ルシフェラーゼの発光値 R、O、G は、測定値 F0、F1、F2 と各フィルター透過率により以下のように算出できます。

$$R= \frac{(T1g*T2o-T1o*T2g)*F0+(T2g-T2o)*F1+(T1o-T1g)*F2}{T1g*T2o+T1r*T2g+T1o*T2r-T1g*T2r-T1r*T2o-T1o*T2g}$$

$$O= \frac{(T1r*T2g-T1g*T2r)*F0+(T2r-T2g)*F1+(T1g-T1r)*F2}{T1g*T2o+T1r*T2g+T1o*T2r-T1g*T2r-T1r*T2o-T1o*T2g}$$

$$G= \frac{(T1o*T2r-T1r*T2o)*F0+(T2o-T2r)*F1+(T1r-T1o)*F2}{T1g*T2o+T1r*T2g+T1o*T2r-T1g*T2r-T1r*T2o-To1*Tg2}$$

この測定原理は、アトー株式会社の特許(第 3585439 号)です。

Ｘ．安全にお使いいただくために

- 本製品を研究用途以外には使用しないでください。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄方法に準じて行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ずおのおのの使用説明書をよく読み、その指示に従って調製・準備を行ってください。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌してください。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合がありますので、試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄してください。

ＸＩ．使用方法のご注意

- 製品の安全性についてのご質問は、下記問い合わせ先にご連絡ください。
- 本製品を火気に近づけないでください。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けてください。
- 手袋・保護用メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けてください。万一、試薬類が目に入ったり、皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けてください。
- 使用期限と保存条件を厳守してください。
- その他、ご不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

= お問い合わせ先（9:00～17：30）=
東洋ビーネット(株)　バイオプロダクツ部
〒104-0031　東京都中央区京橋 2-3-13
TEL: 03-3272-1954
FAX: 03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: http://www.toyo-b-net.co.jp/